第44卷 第1期
2001年2月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44，No.1
Feb.，2001

我国中华按蚊群体分子遗传多态研究

马雅军[1*]，瞿逢伊[1]，徐建农[1]，郑哲民[2]
（1. 第二军医大学基础部寄生虫学教研室，上海 200433；2. 陕西师范大学生命科学学院，西安 710062）

摘要：利用RAPD-PCR技术研究了采自我国9省10个代表点的中华按蚊 *Anopheles sinensis* 自然群体的遗传多态现象，根据23个RAPD等位基因位点进行了分析。结果显示：①多态位点比例为68.2%～86.4%，期望平均杂合度为0.249～0.348，说明中华按蚊群体具广泛的遗传多态现象；②利用3种方法计算 F_{st} 和 θ，平均值为0.069～0.111，相应的迁移率 Nm 为2.0～3.4，表明基因流水平较低；③中华按蚊各自然群体间的遗传一致性达0.8795～0.9973，平均遗传距离为0.041±0.033，属种内变异范围。聚类分析显示，群体间遗传距离与地理位置无对应关系。

关键词：中华按蚊；群体；分子遗传多态
中图分类号：Q969.442.203 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）01-0033-07

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是按蚊中分布最广且最常见的种类之一；它偏嗜动物血液，外栖或半外栖，种群数量大，是我国以往文献记载中疟疾和丝虫病的重要传播媒介；但在不同地理分布区，其生态习性与传病能力有一定差异。有鉴于此，中华按蚊群体遗传多态性研究，已引起有关学者重视[1]。

随机扩增多态DNA（random amplified polymorphic DNA，RAPD）是近年来发展起来的一项DNA多态检测技术[2]，它以10 bp左右的短寡核苷酸为引物（G+C含量一般50%～70%），在一定退火条件下，与基因组DNA中互补序列配对，启动DNA合成。由于该项技术简便快捷，所以一经问世，很快被用于生物的遗传多样性、分类与进化等研究，成为检测DNA多态性有意义的遗传标志。本研究采用该技术对我国不同地区中华按蚊自然群体进行分子遗传多态分析，探讨不同群体间的遗传结构和分化现象，为蚊媒控制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

中华按蚊标本采自我国9省10个代表点现场，详见表1。成蚊经70%酒精浸泡，－20℃保存。全部研究标本均经PCR鉴别，确认为中华按蚊[3]，共247个样本单个进行RAPD-PCR分析。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670663）
* 陕西师范大学博士研究生
收稿日期：1999-05-04；接受日期：1999-10-18

表 1 中华按蚊各群体采集地点

Table 1 Collection sites of *An*. *sinensis* population samples

代号 Code	采集地点 Collection site	采集时间（年·月） Collection time
SD	山东省济宁市唐口镇（N35°，E116°）	1997.7
HEN	河南省郑州市祭城乡（N34°，E113°）	1997.7
SN	陕西省丹凤县河南乡（N34°，E110°）	1996.8
JS	江苏省武进市奔牛镇（N31°，E119°）	1997.7
SC	四川省郫县崇兴乡 （N30°，E103°）	1997.7
	四川省蒲江县大兴乡（N30°，E104°）	1996.7
GZ	贵州省思南县 （N28°，E108°）	1997.5
FJ	福建省建阳市 （N27°，E118°）	1997.9
YN	云南省思茅市土桥镇（N22°，E101°）	1997.5
HN	海南省澄迈县山口镇（N19°，E108°）	1997.5

1.2 方法

1.2.1 RAPD-PCR：蚊基因组 DNA 的制备，按文献报道的方法提取单蚊 DNA[4]，溶于 100 μL 双蒸灭菌水中，置 0℃冰箱保存待用。

建立 RAPD-PCR 扩增体系：反应体积 25 μL，反应液中含 10 mmol/L Tris（pH8.3）、50 mmol/L KCl、1.9 mmol/L $MgCl_2$、0.1 mg/mL BSA、4 种 dNTP 各 0.1 mmol/L、1 U Taq DNA 聚合酶、20 ng 随机引物（上海生工公司）以及单蚊 DNA 2 μL，94℃热变性 1 min 45 s 后，以 94℃ 30 s，37℃ 2 min 和 72℃ 2 min 为条件，在热循环仪（Perkin Elmers 公司、480 型）作 45 个循环，经 1.5%琼脂糖（含 0.5 μg/mL 溴化乙锭）电泳后，紫外灯下观察、照相。

随机引物筛选 9 个，选用其中 2 个引物用于扩增分析，其序列为：CCTTGACGCA（S12）、CCACAGCAGT（S18）。

本研究所用试剂除注明外，均采用国产分析纯同一批号。操作程序严格一致。

1.2.2 RAPD-PCR 结果分析：RAPD-PCR 多态条带大多可作为等位基因的显性标志[2]。二倍体生物中的显性基因可以扩增出 RAPD 条带，而隐性基因则相应无带。由于有带个体分为显性纯合子和显隐性杂合子两种情况，使得这样的标志无法统计杂合子的基因频率，因而无法研究群体的交配类型，也无法验证是否符合哈代-温伯格平衡定律，所以一般运用 RAPD-PCR 多态条带进行群体遗传多态分析时，必须先行建立以下假设：①每个基因位点只有两个等位基因，其中一个可扩增出 RAPD 条带；②各群体均符合哈代-温伯格平衡定律；③隐性等位基因（a）频率 q 由隐性纯合子基因型频率的平方根获得，$1-q=p$ 是显性等位基因（A）的基因频率。

分析时，以标准分子量带作为计算各带分子量的标准，有带时计 1，无带时计 0，记录原始数据，再利用 RAPD（Version 4.0）、PHYLIP（Version 3.5C）、BIOSYS（Version 1.7）等软件包进行数据处理，步骤如下[5,6]：用 RAPDBIOS 计算各等位基因频率，再将其转变成 BIOSYS-1 可识别文件，分别计算各群体多态位点比例（P），由哈代-温伯格估算的期望平均杂合度（He）及其标准差。用 RAPDFST 计算 Wright 的 F_{st}，Lynch 和 Milligan 的 F_{st}，Weir

和 Cockerham 的 θ 以及相应的迁移率 Nm（$Nm=(1-F_{st})/4F_{st}$）。其中，N 是个体数，m 是迁移率。用 RAPDDIST 计算群体间的遗传距离 D（Nei's unbiased genetic distance）（公式见下）和遗传一致性 I[$D=-\ln(I)$]，用 PHYLIP 中的 Neighbor 进行 UPGMA 聚类分析，得到聚类图，再用 Bootstrap 对聚类图进行可信度分析。

$$D=-\ln[G_{XY}/\sqrt{G_X G_Y}]$$

G_X 和 G_Y 分别是所有研究位点 $(2n_X J_X-1)/(2n_X-1)$ 和 $(2n_Y J_Y-1)/(2n_Y-1)$ 的平均数，G_{XY} 是 $\sum X_i Y_i$ 的平均数，J_X，J_Y 分别是 $\sum X_i^2$，$\sum Y_i^2$ 的平均数，其中 X、Y 代表不同的群体，n 为某群体的个体数，X_i，Y_i 分别是 X 和 Y 群体等位基因 i 的基因频率。

2　结果

中华按蚊 9 个群体代表随机引物的扩增结果见图 1。247 个样本用 2 个随机引物共扩增有 23 条带，将此作为分析的指标。

图 1　表 1 各群体中华按蚊单蚊 DNA 随机引物 S12 的扩增结果

Fig. 1　Fragments amplified using primer S12 on DNA extracted from individuals of *An*. *sinensis* from each population in Table 1

泳道 1，16. 分子量标志物（λDNA/*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ）；泳道 2～3. FJ 群体（2 无扩增产物）；泳道 4～5. SC 群体；泳道 6～7. SN 群体；泳道 8～9. JS 群体；泳道 10～11. GZ 群体；泳道 12～13. YN 群体；泳道 14～15. HN 群体；泳道 17～20. SD 群体；泳道 21～24. HEN 群体

Lane 1，16. marker（λDNA/*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ）；lane 2～3. FJ population（lane 2 no results）；lane 4～5. SC population；lane 6～7. SN population；lane 8～9. JS population；lane 10～11. GZ population；lane 12～13. YN population；lane 14～15. HN population；lane 17～20. SD population；lane 21～24. HEN population

群体的遗传多态性常用多态位点的比例和平均杂合度衡量。中华按蚊各群体的多态位点比例（P）和期望平均杂合度（He）见表 2。P 为 68.2%～86.4%，平均 81.8%，可见中华按蚊自然群体具高度的遗传多态性，其中陕西群体的变异程度较低，He 为 0.249，而四川群体的变异程度较高，He 达 0.353。

固定指数 F_{st} 和 θ 通常是衡量等位基因在不同群体之间分化程度的指标，迁移率（Nm）

则可衡量群体间基因交流的水平。本研究分别计算了Wright的Fst，Lynch和Milligan的Fst，Weir和Cockerham的θ，以及相应的Nm（表3）。Fst和θ的平均值为0.069～0.111，表示群体间的差异仅占全部差异的6.9%～11.1%，主要差异属于各群体内部；其相应的迁

表2 中华按蚊各群体样本数（n）、多态位点比例（P）及期望平均杂合度（He）

Table 2 Sample size（n），percentage of polymorphic loci（P），and mean expected heterozygosity per locus（He）in populations of *An. sinensis*

群体代号 Population code	样本数 Sample size	多态位点比例（%） Percentage of polymorphic loci	期望平均杂合度（标准差） Mean expected heterozygosity（SD）
FJ	27	81.8	0.298（0.039）
GZ	23	81.8	0.293（0.037）
SC	43	86.4	0.353（0.036）
YN	29	81.8	0.267（0.034）
HEN	27	77.3	0.293（0.042）
HN	27	86.4	0.308（0.037）
SD	14	86.4	0.332（0.039）
JS	32	86.4	0.348（0.037）
SN	25	68.2	0.249（0.024）
平均 average	27.44	81.8	0.304（0.036）

多态位点的取值是等位基因频率低于0.95 The polymorphic loci defined by the allele frequency less than 0.95

表3 中华按蚊群体各位点的Fst、θ、Nm值

Table 3 Fst，θ and Nm value of each locus in *An. sinensis* populations

位点	Wright		Weir & Cockerham		Lynch & Milligan	
Locus	Fst	Nm	θ	Nm	Fst	Nm
S18-A	0.047	5.1	0.037	6.6	0.064	3.6
S18-B	0.120	20.6	−0.003	−73.8	−0.035	−7.3
S18-C	0.057	4.1	0.049	4.9	0.117	1.9
S18-D	0.096	2.4	0.092	2.5	0.190	1.1
S18-E	0.032	7.6	0.019	12.6	0.042	5.8
S18-F	0.161	1.3	0.166	1.3	0.290	0.6
S18-G	0.058	4.1	0.049	4.8	0.098	2.3
S18-H	0.114	1.9	0.113	2.0	0.201	1.0
S18-I	0.079	2.9	0.073	3.2	0.149	1.4
S18-J	0.073	3.2	0.066	3.5	0.145	1.5
S18-K	0.100	2.3	0.097	2.3	0.152	1.4
S18-L	0.250	0.7	0.264	0.7	0.391	0.4
S18-M	0.065	3.6	0.057	4.1	0.117	1.9
S18-N	0.048	5.0	0.037	6.4	0.080	2.9
S12-1	0.066	3.5	0.059	4.0	0.108	2.1
S12-2	0.061	3.8	0.054	4.4	0.117	1.9
S12-3	0.046	5.2	0.035	6.8	0.070	3.3
S12-4	0.030	8.2	0.017	14.4	0.013	19.0
S12-5	0.041	5.9	0.030	8.0	0.044	5.4
平均 average	0.076	3.1	0.069	3.4	0.111	2.0

移率也很低为2.0～3.4，表明该种按蚊的基因流水平很低，这与按蚊的生活习性密切相关。比较3种计算方法，Lynch和Milligan的方法偏差较大。

全面衡量不同省区的中华按蚊群体间遗传分化程度，可依据其遗传一致性（I）和遗传距离（P）作分析。由表4可见中华按蚊成对群体间的遗传一致性较高为0.8795～0.9973，说明各群体完全一致的基因所占比例高达87.95%～99.73%；各群体间遗传距离相对较小，平均遗传距离为0.041±0.033，根据遗传距离经聚类分析得聚类图（图2），显示遗传距离与各群体地理位置无对应关系。Bootstrap分析其聚类图的可信度均在50%以上。

表4　中华按蚊各群体间的遗传一致性和遗传距离

Table 4　Estimates of Nei's unbiased genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 9 populations of *An. sinensis*

群体 Population	FJ	GZ	SC	YN	HEN	HN	SD	JS	SN
FJ	–	0.9695	0.9828	0.9692	0.9652	0.9814	0.9801	0.9905	0.9473
GZ	0.0310	–	0.9719	0.9870	0.9284	0.9895	0.9842	0.9850	0.9163
SC	0.0173	0.0285	–	0.9572	0.9756	0.9624	0.9721	0.9916	0.9342
YN	0.0313	0.0131	0.0437	–	0.9002	0.9874	0.9899	0.9799	0.8795
HEN	0.0354	0.0743	0.0247	0.1051	–	0.9244	0.9389	0.9570	0.9537
HN	0.0188	0.0106	0.0383	0.0127	0.0786	–	0.9968	0.9842	0.8985
SD	0.0201	0.0159	0.0283	0.0102	0.0630	0.0032	–	0.9973	0.9087
JS	0.0095	0.0151	0.0084	0.0203	0.0439	0.0159	0.0027	–	0.9340
SN	0.0541	0.0874	0.0681	0.1284	0.0474	0.1070	0.0957	0.0683	–

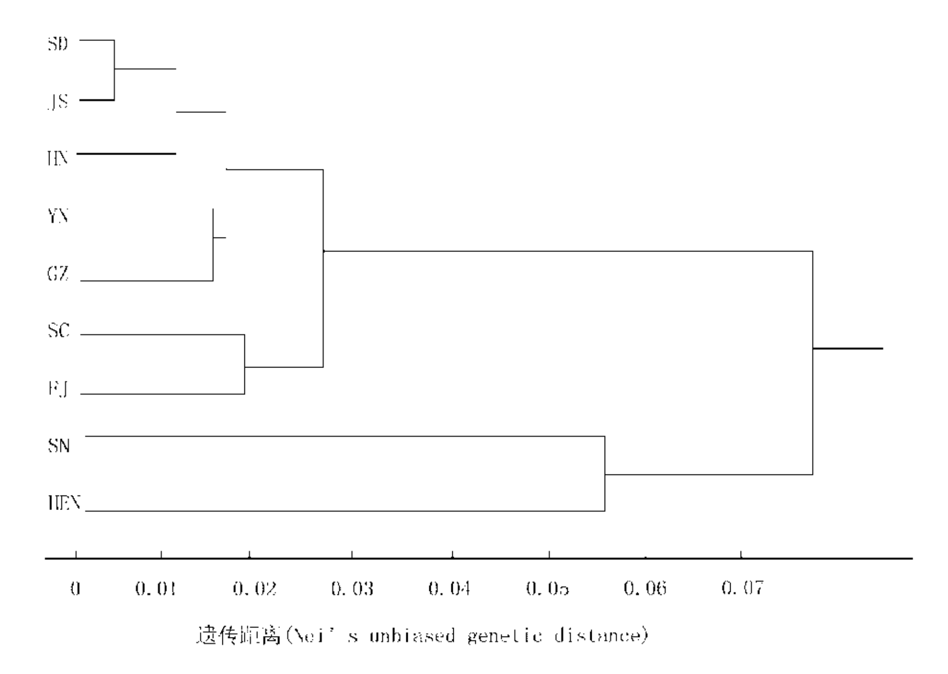


图2　中华按蚊9群体遗传距离聚类图

Fig. 2　Genetic distance dendrogram among 9 populations of *An. sinensis*

3 讨论

本研究利用 RAPD-PCR 技术检测出中华按蚊自然群体中存在着广泛的遗传多态性，多态位点比例较高（81.8%），期望平均杂合度为 0.304；而文献报道利用同功酶标志进行检测，中华按蚊平均杂合度仅为 0.157[7]。将 RAPD 标志与同功酶标志相比较，显示前者结果更加灵敏，这与其他学者认为 RAPD 标志能够揭示许多形态或生理生化指标无法检测到的遗传多态性的观点一致[5,8]。

本研究表明不同地区的中华按蚊群体具有较高的遗传多态性，平均杂合度高于白端按蚊 *An. albimanus*[9]。固定指数（F_{St} 和 θ）提示中华按蚊的遗传变异主要存在于群体内部，其群体间的迁移率 Nm 为 2.0～3.4 与冈比亚按蚊 *An. gambiae* 东非和西非群体的 Nm 值（>3）相近似[10]。理论上讲，若 $Nm > 1$，群体间基因交流可以防止遗传漂变造成的群体分化[11]。遗传距离分析中华按蚊群体间的遗传一致性达 0.8795～0.9973，表明遗传距离与地理位置间没有对应关系，平均遗传距离为 0.041±0.033，属种内变异范围[9,12]。以上结果说明，各地中华按蚊群体的遗传结构基本相同，没有明显分化。

中华按蚊为我国古北界和东洋界的广布种，除青海、新疆外，各地均有分布。尽管宏观上中华按蚊各分布区的地理、气候等条件有一定差异，但其孳生、栖息活动的微生境类型基本相似，多为人类聚居区，嗜吸牛血，兼吸人血，是水稻种植区的优势蚊种，群体数量较大，这些生态特点，保证了中华按蚊各群体间遗传结构的相对稳定。

致谢 真诚感谢提供标本的单位和个人，包括：江苏省武进县血吸虫病防治研究站高佳方、四川省寄生虫病防治研究所雷心田、云南省疟疾防治研究所董学书、海南省热带病防治研究所王志光、贵州省寄生虫病防治研究所邹亚丁、河南医科大学寄生虫学教研室曲传智、山东省寄生虫病防治研究所杨宝金、福建省寄生虫病防治研究所徐保海、辽宁省沈阳市卫生防疫站曹毓存等。

参 考 文 献（References）

[1] 孙延昌，王 玮. 中国中华按蚊不同地理株间的比较研究进展. 昆虫知识，1993，30（1）：56～59

[2] Williams J G K，Kubelik A R，Livak K J *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res.，1990，18（22）：6 531～6 535

[3] Ma Y J，Qu F Y，Xu J N *et al*. Sequence differences of rDNA-ITS2 and species-diagnostic PCR assay of *Anopheles sinensis* and *Anopheles anthropophagus* from China. J. Med. Coll. PLA.，1998，13（2）：123～128

[4] Collins F H，Mendez M A，Rasmussen M O *et al*. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. Am. J. Trop. Med. Hyg.，1987，37（1）：37～41

[5] Apostol B L，Black W C Ⅳ，Reiter P *et al*. Population genetics with RAPD-PCR markers：the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity，1996，76：325～334

[6] Black W C Ⅳ. Fortran programs for the analysis of RAPD-PCR markers in population. Colorado State University，1995

[7] 陈震中，缪建吾，蒋成山. 中华按蚊、长浮按蚊和嗜人按蚊群体中的遗传变异及其进化关系的研究. 昆虫学研究集刊，1985，5：131～142

[8] Wallis G P, Tabachnick W J, Powell J R. Genetic heterogeneity among Caribbean populations of *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1984, 3: 429～498
[9] Narang S K, Seawright J A, Suarez M F. Genetic structure of natural populations of *Anopheles albimanus* in Colombia. J. Amer. Mosquito Contr. Assoc., 1991, 7 (3): 437～445
[10] Lehmann T, Hawley W A, Kamau L *et al*. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* population from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. Heredity, 1996, 77: 192～208
[11] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 1987, 236: 787～792
[12] Hii J L K, Chew M, Sang V Y *et al*. Population genetic analysis of host seeking and resting behavior in the malaria vector, *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol., 1991, 28: 675～684

Study on molecular genetic polymorphism of *Anopheles sinensis* populations in China

MA Ya-jun[1], QU Feng-yi[1], XU Jian-nong[1], ZHENG Zhe-min[2]
(1. Department of Parasitology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;
2. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xian 710062, China)

Abstract: Samples of *Anopheles sinensis* from 10 collection sites in 9 provinces of China were analyzed for genetic polymorphism using RAPD-PCR. Twenty-three RAPD loci were studied and the results were as follows: ① The percentage of polymorphic loci was 68.2%～86.4%, and the expected mean heterozygosity was 0.249～0.348, which indicated extensive genetic polymorphism in the natural populations of *An. sinensis*. ② The *Fst* and *θ* were caculated using 3 measures. Mean values were 0.069～0.111 with corresponding migrating rate of 2.0～3.4. It indicated that the level of gene flow was low. ③The genetic identity among the natural populations was 0.8795～0.9973 with the mean genetic distance of 0.041±0.033. The data are within the range of intraspecific variation. Cluster analysis revealed that the genetic distance did not relate to the collection sites.

Key words: *Anopheles sinensis*; population; molecular genetic polymorphism